

CONSERVADOR DE HENO Y MÉTODOS PARA LA CONSERVACIÓN DE HENO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se relaciona con un
5 conservador de heno. Más específicamente con un conservador
de heno para conservar heno en heno de alta humedad
almacenado y el método para utilizar el conservador de heno
para la conservación de heno en heno de alta humedad
almacenado.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Dejar marchitar el heno a un nivel de humedad
óptimo en el campo antes del embalaje sería una situación
óptima con la finalidad de reducir la pérdida de materia
seca (DM), crecimiento de mol y respiración celular de la
15 planta durante el embalaje y almacenamiento del heno. Sin
embargo, este proceso resulta en considerables pérdidas
nutrimentales debido a la respiración continua de las
plantas, hojas que se destrozan por el daño mecánico y
lixiviación debida a la lluvia. El reconocimiento de este
20 hecho, y también debido a las condiciones climáticas
impredecibles, ha llevado a que muchos productores embalen
heno a un contenido de humedad mayor que el óptimo (20-30%)
para minimizar el riesgo de daño por lluvia y pérdidas
mecánicas de hojas. Esta práctica, sin embargo, resulta en
25 pérdida debido a las actividades de levaduras y mohos, y a

veces bacterias y el calentamiento y calidad nutritiva deficiente resultante de heno al momento de la alimentación.

Un procedimiento simple ha sido rociar el heno húmedo al momento de almacenamiento con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico. Aunque los ácidos orgánicos generalmente son efectivos para evitar la proliferación fúngica en heno húmedo, las mayores tasas de aplicación, el aumento de costos de campo y de manejo así como las preocupaciones ambientales hacen que la mayoría de los productores sean renuentes para utilizarlos.

Aunque la investigación muestra que los inoculantes a base de bacterias potencialmente podrían reemplazar los ácidos orgánicos en la conservación de heno embalado por encima del contenido de humedad óptimo (Baah et al., Asian-Aust. J. Anim. Sci. 18:649- 660, 2005.) los resultados de otros estudios sobre ensilado y en olaje han sido consistentes (Zahiroddini et al., Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19(10):1429-1436, 2006, Muck, Trans. ASAE 47:1011-1016, 2004). Existe una amplia evidencia para indicar que las inconsistencias aparentes en respuesta a los inoculantes de deben a las interacciones entre las especies microbianas en los inoculantes individuales y a las poblaciones microbianas epifíticas (bacterias, levaduras y mohos) sobre el heno antes de la inoculación.

Sería altamente deseable disponer de un conservador de heno mejorado, particularmente para evitar y reducir el daño por calor del heno en heno de alta humedad almacenado y así como para conservar el mismo.

5 Uno de los problemas con el heno de alta humedad es el deterioro y decaimiento provocado por calor generado espontáneamente. Estos embalajes calientes usualmente son más deficientes en color, valor nutricional y tienen mayor moho visible. Un procedimiento ha sido rosear el heno
10 húmedo al momento de almacenado con un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, ácido propiónico. Aunque los ácidos orgánicos generalmente son efectivos para evitar la proliferación fúngica en heno húmedo, las mayores tasas de aplicación, el aumento de costos de campo y de manejo así
15 como las preocupaciones ambientales hacen que la mayoría de los productores sean renuentes para utilizarlos.

Aunque las investigaciones muestran que los inoculantes basados en bacterias potencialmente podrían reemplazar los ácidos orgánicos en la conservación de heno
20 embalado por encima del contenido óptimo de humedad, los resultados de otros estudios sobre ensilado y henolaje han sido inconsistentes. Existe una amplia evidencia para indicar que las inconsistencias aparentes en respuesta a los inoculantes se deben a las interacciones entre las
25 especies microbianas en los inoculantes individuales y a

las poblaciones microbianas epifíticas (bacterias, levaduras y mohos) sobre el heno antes de la inoculación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente descripción proporciona un método
5 para conservar la calidad del heno en heno de alta humedad almacenado. El método se basa en el uso de un conservador capaz de evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad almacenado. El conservador de heno utilizado evita y/o reduce el calor en heno de alta humedad de forma
10 igual o mejor que los ácidos orgánicos.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, el método comprende agregar al heno una conservación de heno
15 que comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa, ya sea sola o en combinación con una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura
20 del genero *Pichia* o bacteria del genero *Pediococcus*. En otro aspecto, se proporciona un método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, el método comprende agregar al heno una conservación de heno que
25 comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva

de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, el método comprende agregar al heno una conservación de heno que comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura del genero *Pichia*.

En todavía un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, el método comprende agregar al heno una conservación de heno que comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa en combinación con cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una bacteria de reducción de calor del genero *Pediococcus*.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, el

método comprende agregar al heno una conservación de heno que comprende una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura del genero *Pichia*.

En un aspecto adicional, se proporciona un
5 conservador de heno que comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa.

En todavía un aspecto adicional, se proporciona
10 una conservación de heno que comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de
15 una levadura del genero *Pichia* o bacteria del genero *Pediococcus*.

En un aspecto adicional, se proporciona una conservación de heno que comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción
20 de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura del genero *Pichia*.

En un aspecto, se proporciona una conservación de
25 heno que comprende una conservación de heno y una cantidad

efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa en combinación con un conservador de calor y una cantidad efectiva de una bacteria de reducción de calor del genero
5 *Pediococcus*.

En un aspecto adicional, todos los aspectos mencionado previamente además pueden comprender al menos una enzima que tenga una actividad pectin liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

10 En otro aspecto, se proporciona una conservación de heno que comprende una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura del genero *Pichia*.

En un aspecto adicional, se proporciona una
15 conservación de heno que comprende cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una enzima de reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa ya sea sola o en combinación con una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de
20 calor de una levadura del genero *Pichia* o bacteria del genero *Pediococcus*. El heno del alta humedad además pueden comprender al menos una enzima que tenga una actividad pectin liasa, una actividad glucanasa o una mezcla de las mismas.

25 En otro aspecto, se proporciona un heno de alta

humedad que comprende una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura del genero *Pichia*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 De esta manera, habiendo descrito generalmente la naturaleza de la invención, ahora se hará referencia a las figuras anexas, que muestran a manera de ilustración, una modalidad preferida de la misma, y en las cuales:

La Figura 1 ilustra la temperatura media semanal
10 durante el almacenamiento de embalajes de heno de alfalfa tratados con una levadura del genero *Picha* (P. anómala) o al menos un enzima que tenga una actividad quitinasa (enzima); en comparación con los embalajes de heno de alfalfa tratados con ácido propiónico (Ácido Prop.) y no
15 tratados.

La Figura 2 ilustra la temperatura media diaria durante el almacenamiento de los embalajes de heno de alfalfa tratados con al menos una enzima que tiene una actividad cinasa en combinación con una cantidad efectiva
20 de conservación de heno y reducción de calor de una levadura del genero *Pichia* (PichChit) o bacteria del genero *Pediococcus* (Pedio pe), en comparación con los embalajes de heno de alfalfa tratados con ácido propiónico (PROP) y no tratados.

25 La Figura 3 ilustra una gráfica del tiempo

transcurrido en minutos por encima de 40°C durante el almacenamiento (2012) de los lotes de heno de alfalfa tratados con al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una levadura del genero *Picha*(*Pichia* +Enz) o una bacteria del genero *Pediococcus* (*Pedio* +Enz), en comparación con los embalajes de heno de alfalfa tratados con ácido propiónico (Ácido Prop.) y no tratados (Control); y

La Figura 4 ilustra una gráfica del tiempo transcurrido en minutos por encima de 40°C durante el almacenamiento (2013) de los embalajes de heno de alfalfa tratados con al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa en combinación con una levadura del genero *Pichia* (*Pichia* +Enz) o una bacteria del genero *Pediococcus* (*Pedio* +Enz), en comparación con los embalajes de heno de alfalfa tratados una levadura del genero *Pichia* sola (*Pichia*) una bacteria del genero *Pediococcus* sola (*Pedio*), Ácido propiónico (Ácido Prop.) y no tratados (Control).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En este aspecto más amplio, la presente descripción proporciona un método para conservar la calidad del heno y evitar o reducir el daño por calor en heno de alta humedad almacenado, el método comprende tratar heno fresco bajo condiciones aeróbicas con un conservador de heno.

El conservador de heno que comprende una conservación de heno y una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado que el conservador de heno se mejora incluso más desde el punto de vista de su efecto conservador y su capacidad para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad si al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con una

10 levadura del genero *Pichia* o bacteria del genero *Pediococcus*. Cuando al menos un enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con una levadura del genero *Pichia* o una bacteria del genero *Pediococcus*, la reducción de temperatura del heno de alta humedad se mejora

15 significativamente por la combinación, en comparación con la utilización de cada componente de la combinación sola como se muestra en la Figura 4.

Alternativamente, el conservador de heno puede comprender una cantidad efectiva de conservación de heno y

20 reducción de calor de una levadura del genero *Pichia* sola.

El término "conservador de heno y cantidad efectiva de reducción de calor" cuando se utilizan en la presente se entenderán para referirse a una cantidad que es al menos la suficiente para conservar la calidad del heno.

25 De esta manera, la cantidad es al menos suficiente para

evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo.

El término "heno" cuando se utiliza en la presente se entenderá para referirse a toda forma de heno como el término se utiliza comúnmente en la agricultura. El heno más comúnmente se compone de alfalfa, pasto o mezclas de alfalfa y pasto cultivadas a un nivel de humedad objetivo inferior a 20%.

El método para tratar heno y/o evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, puede incluir agregar al heno una conservación de heno que comprende una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tenga una actividad quitinasa. Como se menciona previamente, al menos un enzima que tiene una actividad quitinasa puede combinarse con una levadura del genero *Pichia* o bacteria del genero *Pediococcus*.

En una modalidad, el método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, puede incluir agregar al heno una conservación de heno que comprende una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura de reducción de

calor del genero *Pichia*.

En otra modalidad, el método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, puede incluir
5 agregar al heno una conservación de heno que comprende una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de al menos una enzima que tiene actividad quitinasa en combinación con una cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una bacteria del genero
10 *Pediococcus*.

Alternativamente, el método para tratar heno para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad así como para conservar el mismo, puede incluir
agregar al heno una conservación de heno que comprende
15 cantidad efectiva de conservación de heno y reducción de calor de una levadura del genero *Pichia* sola.

La levadura del genero *Pichia* incluye, pero sin limitarse a *Pichia* anómala sp. En una modalidad, la levadura del genero *Pichia* puede ser una *Pichia* anómala sp
20 que tiene todas las características de identificación de *Pichia* anómala que tiene el número de acceso DBVPG cepa 3003. Se entenderá que cualquier aislado que tenga las características de identificación de *Pichia* anómala que tiene el número de acceso DBVPG cepa 3003, incluyendo sub
25 cultivos y variantes de los mismos que tengan las

características de identificación y actividad como se describe en la presente se incluyen. La *Pichia* anómala que tiene en número de acceso DBVPG cepa 3003 se depositó en la Industrial Yeast Collection DBVPG del Dipartimento di
5 Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali e Zootechniche, Sezione di Microbiologia Agroalimentare ed Ambientale, <http://www.agr.unipg.it/dbvpg>, Universidad de Perugia, Italia.

La bacteria del genero *Pediococcus* incluye, pero
10 no se limita a *Pediococcus pentosaceus* sp. En una modalidad, la bacteria del genero *Pediococcus* puede ser de un *Pediococcus pentosaceus* sp que tiene todas las características de identificación de la cepa BTC328 de *Pediococcus pentosaceus* (que tiene el número de acceso
15 NCIMB 12674). En una modalidad adicional, la bacteria del genero *Pediococcus* puede ser de un *Pediococcus pentosaceus* sp. que tenga todas las características de identificación de la cepa BTC401 de *Pediococcus pentosaceus* (que tiene el número de acceso NCIMB 12675). Se entenderá que cualquier
20 aislado que tenga las características de identificación de la cepa BTC328 o BTC401 de *Pediococcus pentosaceus*, incluyendo sub cultivos y variantes de los mismos que tengan las características de identificación y actividad como se describe en la presente se incluyen. Las cepas de
25 *Pediococcus pentosaceus* que tienen en número de acceso

NCIMB 12674 y 12675 se depositaron en el National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA.

5 En una modalidad el margen de tratamiento para heno típicamente es de organismos viables de 10^5 a 10^{15} de la levadura o bacteria por tonelada de heno, de preferencia organismos viables de 10^7 a 10^{13} de la levadura o la bacteria por tonelada de heno, y más de preferencia de
10 organismos viables de 10^9 a 10^{12} de la levadura o la bacteria por tonelada de heno. El término "toneladas" cuando se utiliza en la presente se entenderá que se refiere a una tonelada métrica (1000 kg).

 Al menos una enzima que tiene una actividad
15 quitinasa puede ser una actividad quitinasa en un margen de aproximadamente 6 a aproximadamente 300 unidades de enzima (U) por tonelada de heno que ha de tratarse. En la modalidad, la actividad quitinasa puede encontrarse en un margen de aproximadamente 6 a aproximadamente 100 U por
20 tonelada de heno que ha de tratarse. Una U se define como la cantidad de la enzima que produce una cierta cantidad de actividad quitinasa. Cada unidad de enzima (U) puede liberar aproximadamente 1.0 mg de N-acetil-D-glucosamina de quitina (g) por hora a pH 6.0 y a una temperatura de 25°C
25 en un ensayo de 2 horas.

El conservador de heno de acuerdo con la presente descripción además puede comprender al menos una enzima que tenga una actividad Pectin liasa, una actividad Glucanasa o una mezcla de las mismas.

5 El conservador de heno de acuerdo con la presente descripción puede encontrarse ya sea en forma líquida o sólida. El conservador de heno de acuerdo con la presente descripción puede comprender un portador adecuado o puede utilizarse como se encuentra. En la forma sólida, el
10 conservador de heno puede comprender portadores sólidos o diluyentes físicos. Este portador adecuado puede encontrarse en forma líquida acuosa o no acuosa o en forma sólida. Ejemplos no limitantes de portadores de forma líquida acuosos y no acuoso incluyen agua, aceites y
15 parafina. Ejemplos no limitantes de portadores de forma sólida incluyen portador orgánico o inorgánico tal como, por ejemplo, malto-dextrina, almidones, carbonato de calcio, celulosa, lacto suero, mazorcas de maíz molido y dióxido de silicona. La forma sólida puede aplicarse
20 directamente al heno en la forma de un polvo para espolvorear ligero, o si se distribuye en un portador líquido puede rociarse satisfactoriamente en el heno. Se entenderá que cualquier otro portador adecuado con el fin de la presente invención puede utilizarse. También se
25 entenderá que el conservador de heno de acuerdo con la

presente descripción puede aplicarse al heno utilizando técnicas estándar comunes para aquellos con experiencia en la ordinaria técnica. El conservador de heno también puede aplicarse antes, durante y/o después del embalaje. La
5 presente invención se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos los cuales se proporcionan para ilustrar la invención en lugar de limitar su alcance.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1:

Heno, condiciones de tratamiento y embalaje

El heno fue un tercer corte que consiste en el 90% de alfalfa y 10% cebadilla. El heno se cortó con un New-Holland™ disc-bine el 17 de Septiembre de 2011 y se
15 dejó secar sin acondicionar y sin perturbar. Se evaluó el nivel de humedad utilizando un probador de humedad de heno en hilera Farmex™ (1205 Danner Drive, Aurora, OH) cinco días después del corte y se encontró que oscila de 20 a 35%. En este momento los conservadores de heno se
20 prepararon al pre-pesar los inoculantes y mezclar cada uno de ellos en contenedores separados que contienen 6.5 L de agua destilada pre-medida y agitada durante 1 minuto. Un tanque aspersor y una pluma aspersora con una sola boquilla se montó en un embalador cuadrado grande 4790 Hesston. La
25 pluma se colocó de modo que el patrón de aspersión cubrió

el 90% de la hilera con desviación mínima.

Se realizaron dos embalajes de ensayo para determinar el tiempo para completar la aplicación del aditivo en un embalaje, peso del embalaje así como una
5 medición más precisa del contenido de humedad del material embalado. Se determinó la humedad de embalaje utilizando una sonda de heno. Se encontró que el tiempo promedio para hacer un embalaje (0.91 m x 1.22 m x 22.44 m) es de 2 minutos y 30 segundos y se encontró que el peso promedio
10 del embalaje es de 820 kg. La tasa de aplicación de *P.anomala* fue de 10^{11} CFU en 1 L por tonelada de heno. La enzima que tiene una actividad quitinasa se aplicó a una tasa de 1.5 g (suspendidos en 1 L de agua) por tonelada de heno, correspondiente a aproximadamente 6 U por tonelada de
15 heno. Se aplicó producto de ácido propiónico compuesto de ácido propiónico al 68% (vol/vol) a una tasa de 2.72 L/ton y se consideró como un control positivo. El control negativo fue agua, y se aplicó a una tasa de 1 L por tonelada de heno. Se obtuvieron *P. anomala* y la enzima que
20 tiene una actividad quitinasa de Lallemand Specialties Inc. (Milwaukee, WI, EE. UU.) mientras que el ácido propiónico fue de Wausau Chemical Corporation (Wausau, WI, EE. UU.). Se realizaron cinco embalajes de réplica para cada tratamiento. Las muestras de *P. anomala* se tomaron después
25 de cada aplicación para verificar la viabilidad y el número

de organismos. Esto fue para hacer posible la confirmación de la tasa de aplicación para el organismo. Cada embalaje se etiquetó inmediatamente después de su salida del embalador utilizando pintura por aspersión y después con
5 etiquetas unidas a bridas. Todos los embalajes se pesaron un día después del embalaje y se muestrearon del centro. Los embalajes se dejaron en el campo durante 2 semanas después del embalaje, para reducir el riesgo de combustión, antes de ser una sola capa transportada y almacenada en un
10 cobertizo de heno de lado abierto. Los embalajes se muestrearon del centro de nuevo el día 90 de 4 lados (excluyendo las partes superior e inferior de los embalajes) y se reapilaron encima de las otras (pilas de dos embalajes). Las muestras de centro se tomaron de nuevo
15 el día 180.

Determinación microbiológica química

Se llevaron a cabo análisis químicos y microbiológicos en muestras de heno recolectadas de 6 secciones diferentes del campo y en muestras de centro
20 compuestas obtenidas de cuatro ubicaciones diferentes en cada embalaje el día 1, 90 y 180 de almacenamiento. Los procedimientos indicados por McAllister et al. (1995. Intake, digestibility and aerobic stability of barley silage inoculated with mixtures of *Lactobacillus plantarum*
25 and *Enterococcus faecium*. Can. J. Anim. Sci. 75:425-432.)

se utilizaron para enumerar las bacterias totales, bacterias de producción de ácido láctico (LAB), levaduras y mohos. Se determinó la materia seca (DM), materia orgánica (OM) y proteína cruda (CP) de acuerdo con los procedimientos de AOAC (1990), y la fibra de detergente neutral (NDF), fibra de detergente ácido (ADF), y nitrógeno insoluble de detergente ácido (ADIN) como se describe por Van Soest et al., (1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74 3583-3597.)

Tabla 1. Composición química (% DM), pH y composición microbiológica (cfu log₁₀) del heno 90 días después del tratamiento con diversos conservadores de heno en el embalaje¹.

Factor ²	Día 0	PA	CE	BPA	CON
DM	81.95	87.32	86.59	86.08	84.68
pH	6.25	6.11	6.24	6.00	6.36
TB	-	7.14	6.60	6.10	7.51
LAB	3.80	5.42 ^{bc}	4.77 ^c	4.88 ^c	6.29 ^a
LEVADURA	6.48	5.57	5.94	5.38	6.20
MOHO	5.41	5.25	5.18	4.77	5.34
OM	87.89	88.10 ^a	85.28 ^c	88.27 ^a	88.02 ^a
NH ₃ , mg kg ⁻¹	0.336	0.479	0.841	0.583	1.017
TN	3.5	3.46	3.67	3.58	3.55
LA,					

	(g kg ⁻¹)	-	0.051 ^b	0.094 ^a	0.099 ^a	0.129 ^a
	NDF	45.52	-	-	-	-
	ADF	33.19	31.23	30.79	30.49	31.86
	ADIN	0.375	0.273 ^{ab}	0.229 ^b	0.254 ^b	0.255 ^b
5	ADIN, (%TN)	10.75	7.92 ^{ab}	6.23 ^c	7.16 ^{bc}	7.19 ^{bc}

¹PA=*Pichia anomala*; CE = Enzimas con actividad quitinasa; BPA= ácido propiónico; CON=Control.

²TB=bacterias no exigentes que crecen en el agar de nutrientes; LAB=bacterias que crecen en MRS se asume que son lactobacilos; OM= Materia orgánica; NH₃=Amoniaco; TN=Nitrógeno total; LA= ácido láctico; ADF= fibra de detergente ácido; ADIN=nitrógeno insoluble de detergente ácido.

10 La Tabla 1 muestra el efecto de los tratamientos de conservadores de heno en los perfiles químicos y microbiológicos de las muestras del heno recolectado el día 0 (día de embalaje) y 90 días posteriores al embalaje. Además del ácido láctico y el nitrógeno insoluble de
15 detergente (ADIN), los diversos tratamientos no afectan ninguno de los factores evaluados, es decir, pH, nitrógeno total, amoniaco y ADF. La concentración de ácido láctico fue inferior en los tratamientos de *P. anomala* en comparación con otros tratamientos. En comparación con
20 otros tratamientos el nivel de ADIN (% DM) fue mayor en el tratamiento de *P. anomala*. Las poblaciones de bacterias (bacterias no exigentes que crecen en el agar de nutrientes), levaduras mohos totales en el día 90 las muestras de heno no se afectaron por el tratamiento. En
25 comparación con otros tratamientos, las poblaciones de

lactobacilos fueron mayores en *P. anomala* y los embalajes de control que han aumentado de $\log_{10}$ 3.80 CFU g⁻¹ en el día de embalaje a $\log_{10}$ 5.42 y $\log_{10}$ 6.29 CFU g⁻¹, respectivamente el día 90.

5 Tabla 2. Composición química (% DM), pH y composición microbiológica (cfu $\log_{10}$) del heno en el día 180 después del tratamiento con diversos inoculantes en el embalaje¹.

10	Factor²	PA	CE	BPA	CON
	DM	87.89 ^a	87.72 ^{ab}	85.64 ^b	85.79 ^b
	pH	6.00 ^b	6.14 ^a	6.11 ^a	6.17 ^a
	NA	6.14	7.25	7.23	7.23
	MRS	5.21	6.32	6.28	6.74
15	LEVADURA	5.25 ^{ab}	5.82 ^a	4.67 ^b	4.27 ^b
	MOHO	5.48	5.37	6.24	6.08
	OM	88.59	87.93	87.80	87.63
	NH3 (mg.kg⁻¹)	0.418	0.565	0.635	0.704
	TN	3.26	3.57	3.56	3.53
20	LA (g.kg⁻¹)	0.983	0.970	1.052	1.453
	NDF	44.18 ^b	44.78 ^b	46.33 ^b	50.07 ^a
	ADF	32.35	32.76 ^b	32.72 ^b	34.55 ^a
	ADIN	0.262	0.253	0.245	0.268
	ADIN, (%TN)	8.03	7.17	6.96	7.58

¹PA=*Pichia anomala*; CE=Enzimas con una actividad quitinasa;
BPA=ácido propiónico; CON=Control.

²TB= bacterias no exigentes que crecen en el agar de nutrientes; LAB=bacterias que crecen en MRS se asume que son *Lactobacilli*; OM= Materia orgánica; NH₃=Amoníaco; TN=Nitrógeno total; LA= ácido láctico; ADF= fibra de detergente ácido; ADIN=nitrógeno insoluble de detergente ácido.

Además del pH y la población de levadura, no existieron diferencias entre los tratamientos en la composición química y microbiológica en las muestras de 180 días (véase la Tabla 2). En comparación con todos los otros tratamientos, el pH fue el más bajo en *P.anomala* (6.00). La población de levadura fue la más alta en las enzimas con un tratamiento de actividad de quitinasa.

Tabla 3. Concentraciones de ácidos grasos volátiles (VFA) en muestras de centro de heno después de 90 y 180 días posteriores al tratamiento con diversos aditivos en el embalaje¹.

VFA	PA	CE	BPA	CON
Acetato (g kg ⁻¹)				
90 d	8.95	8.55	10.53	6.97
180 d	9.69	9.58	8.38	7.28
Propionato (g kg ⁻¹)				
90 d	0.1333	0.1267	0.4667 _a	0.1467
180 d	0.0675	0.080	0.426 ^a	0.052
VFA Total (g kg ⁻¹)				
90 d	9.14	8.72	11.04	7.17
180 d	9.87	9.76	8.89	7.42

¹PA=*Pichia anomala* ; CE=Enzima con una actividad quitinasa;

BPA=ácido propiónico; CON=Control.

Con referencia ahora a la Tabla 3, las concentraciones de VFA total (ácidos grasos volátiles) y acetato tanto en las muestras de 90 días como las de 180 no se afectaron por el tratamiento. El VFA predominante producido después de 180 días de almacenamiento fue acetato y este justifico 94% a 98% del VFA total producido en los embalajes. Existió una tendencia hacia mayor acetato y VFA total en los embalajes tratados con *P.anomala* y enzimas con una actividad quitinasa después de 180 días de almacenamiento. Las concentraciones de acetato y VFA total en *P. anomala* y en los embalajes de 180 días tratados con enzimas con una actividad quitinasa fueron al menos 14% mayores que las concentraciones en los otros tratamientos indicando que ambos de estos tratamientos inducen un mayor grado de fermentación microbiana anaeróbica en los embalajes en comparación con los otros tratamientos. En comparación con el tratamiento control, las concentraciones de VFA total y acetato fueron aproximadamente 32% mayores en *P.anomala*- que en los embalajes de 180 días tratados con enzimas con una actividad de quitinasa. Como se espera, la concentración de propionato en los embalajes tratados con ácido propiónico fue mayor que las concentraciones en los otros tratamientos en las muestras de 90 d y 180 d, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 4. Evaluación de Calidad del heno tratado

con diversos aditivos y almacenado durante 180 días.

	Factor de Calidad	Embalaje #				
			PA	CE	BPA	CON
5	COLOR	1	5	18	10	17
		2	17	18	5	5
		3	17	10	12	5
		4	5	-	10	10
		5	17	0	7	15
10		<i>Media</i>	12.2	15.3	8.8	10.4
	OLOR	1	2	12	12	12
		2	10	15	0	0
		3	17	5	12	0
		4	10	0	5	0
		5	17	0	5	12
		<i>Media</i>	11.2	10.7	6.8	4.8
	GENERAL	1	7	30	22	29
		2	27	33	5	5
		3	34	15	24	5
		4	15	0	15	10
		5	34	0	12	27
15		<i>Media</i>	23.4	26	15.6	15.2
	GRADO	1	P	G	P	A
		2	VG	G	VP	VP
		3	G	P	P	VP
		4	G	-	VP	VP
		5	G	-	P	P

PA=Pichia anomala; CE = Encimes con actividad quitinasa;
BPA= ácido propiónico; CON=Control.

Color/Olor -con base en hoja de hechos de la extensión
cooperativa de Sheet #644 'Evaluando Calidad de Heno'

(<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

Color

Heno con color verde brillante tiene puntaje alto (15 a
20).

Heno de amarillo dora a amarillo tienen puntaje de 5 a 15
puntos

Heno de café obscuro a café tienen puntaje de 0 a 5 puntos

OLOR

Henos con olor rancio u otros olores desagradables tienen puntaje de 5 a 15 puntos.

Henos mohosos o inusualmente polvorientos tienen puntaje muy bajos (0 a 5 puntos)

Grado

El grado se basa en la evaluación general por el examinador la cual incluye; muy pobre, pobre, promedio, bueno, muy bueno y excelente

5

Todos los embalajes se abrieron el día 180 y su calidad se hace en la hoja de hechos de la extensión cooperativa de Maryland #644. Con base en la evaluación visual y sensorial, los tratamientos de control y ácido propiónico produjeron heno de la más baja calidad mientras el resto de los tratamientos produjeron heno de calidad promedio a buena (Tabla 4).

Estabilidad de temperatura

La estabilidad de temperatura de los embalajes se monitoreo al medir continuamente la temperatura interior de cada embalaje con tres Dallas Thermochron iButtons (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY) que se insertaron en los orificios de centro la siguiente mañana después del embalaje. Los iButtons se configuraron para registrar las temperaturas cada hora durante los primeros 60 días y el periodo de almacenamiento. Debido a que las lecturas de temperatura no mostraron calentamiento adicional las sondas no se colocaron de nuevo en los embalajes después de 60 días. Los embalajes se abrieron y se calificaron visualmente para el agrado de deterioro y moho en el

25

extremo del periodo de almacenamiento (d 180) con base en la hoja de hechos de la extensión corporativa de Maryland # 644 'Evaluando la Calidad de Heno' (<http://www.extension.umd.edu/publications/pdfs/fs644.pdf>).

5 Como se muestra en la Figura 1, la temperatura ambiente semanal promedio (área de almacenamiento de embalaje) se redujo desde una altura de aproximadamente 16°C durante la primera semana de almacenamiento hasta temperaturas bajo cero después de la semana 7. Sin embargo, 10 las temperaturas en todos los embalajes permanecieron por encima de 20°C durante las primeras tres semanas del periodo de almacenamiento. La temperatura semanal más alta (aproximadamente 34°C) se registró durante la semana 2 en los embalajes de control. La temperatura promedio en los 15 embalajes de control durante las primeras 3 semanas fue aproximadamente 30°. Las temperaturas en los embalajes tratados con enzimas con una actividad quitinasa fueron consistentemente inferiores que las de los embalajes de control de la semana 1 a la semana 7 (Figura 1). Una 20 tendencia similar (excepto durante la semana 2) se observó cuando el tratamiento se comparó con el tratamiento de ácido propiónico (Figura 2). Aunque todos los tratamientos tuvieron un efecto positivo para descender la temperatura en los embalajes durante el periodo de almacenamiento, el 25 tratamiento más efectivo; en comparación tanto con el

tratamiento de control como con el de ácido propiónico, fueron las enzimas con una actividad quitinasa. En comparación con los embalajes tratados con control y ácido propiónico, las temperaturas promedio en los embalajes
5 tratados con enzimas con una actividad quitinasa fueron 6-8°C y 4-5°C inferiores que las temperaturas en los embalajes tratados con control y ácido propiónico, respectivamente, durante el mismo periodo.

Experimento en animales

10 La tasa *in situ* y la medida de la desaparición de DM y NDF de las muestras de heno de 180 días se determinó en tres vacas dotadas con cánulas ruminales y alimentadas con una dieta de procedencia de corral de engorde estándar que consiste de 50% de heno timothy más 50% de ensilado de
15 cebada (base de DM). Las submuestras de las muestras de centro de 180 días obtenidas de los embalajes tratados con el mismo conservador se combinaron y molieron para pasar a través de un tamiz de 4 mm. Aproximadamente 4 g de muestra combinada se pesó en bolsas Dracon e incubo en triplicado
20 en cada vaca durante 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, y 120 h. las bolsas se fabricaron de una malla de poliéster de monofilamento (tamaño de poro de 53 μm , 5 cm x 20 cm, Ankom, Fairport, New York). Se dieron dos semanas a las vacas para adaptarse a sus dietas antes de iniciar las
25 incubaciones. Inmediatamente después de la incubación, las

bolsas se enjuagaron con agua de grifo fría hasta que todo el contenido de rumen en el exterior de las bolsas se había removido. Las bolsas se lavaron en una lavadora doméstica en agua fría durante tres minutos utilizando el ciclo de lavado delicado sin detergente y el ciclo de centrifugado. El procedimiento de lavado se repitió una vez. Se lavaron conjuntos duplicados de bolsas no incubadas que contienen muestras de cada tratamiento con las bolsas anteriores y se utilizaron para estimar la desaparición en 0 h para cada tratamiento. Después, todas las bolsas se secaron en un horno de aire forzado a 55°C durante 48 h. Los residuos de las bolsas triplicadas del mismo tratamiento incubadas en la misma vaca se agruparon y molieron para pasar a través de un tamiz de 1 mm antes de analizarse para NDF según el método mencionado en lo anterior. El porcentaje de desaparición de DM y NDF se calculó a partir de la proporción restante en las bolsas después de cada tiempo de incubación. Los datos de desaparición de DM y DNF se ajustaron a una versión modificada del modelo exponencial de Orskov y McDonald (1979) con una fase de retraso:

$$p = a + b(1 - e^{-c(t - \text{latencia})}) \text{ para } t > \text{latencia}$$

p es desaparición (%) DM o NDF después de t horas, a es la fracción que desaparece rápidamente (%), b es la fracción de desaparición lentamente (%), y c es la tasa fraccional de desaparición (h^{-1}) de la fracción b. Los

parámetros se estimaron mediante un procedimiento no lineal interactivo (método de Marquardt) con el paquete de software de SAS (1990). La desaparición efectiva (EFFD, %) en 48 h de incubación se estimó con base en una tasa de flujo de salida fraccional asumida de 6%.

Tabla 5. Efecto del conservador ¹ de heno en la desaparición (%) ² de DM in situ de heno de alfalfa-bromo incubado en el rumen de vacas Jersey.

Desaparición ³				
	PA	CE	BPA	CON
12 h	66.65 ^a	62.92 ^c	62.20 ^c	61.38 ^c
24 h	75.13 ^a	72.65 ^b	72.84 ^b	70.86 ^o
48 h	78.37 ^a	77.22 ^a	78.57 ^a	75.62 ^b
<i>Cinética</i>				
a	34.13	34.65	33.34	34.37
b	44.62 ^{ab}	43.21 ^b	46.38 ^a	42.11 ^b
c, h ⁻¹	0.114 ^a	0.089 ^{bc}	0.083 ^c	0.087 ^c
Potencial	78.75 ^a	77.86 ^{ab}	79.72 ^a	76.48 ^b
Efectivo	62.92 ^a	60.40 ^b	59.97 ^b	59.09 ^b

¹PA=*Pichia anomala*; CE= enzimas con una actividad quitinasa BPA=Ácido Propiónico; CON=Control.

²Las medias en la misma fila con diferentes superíndices difieren ($P < 0.05$).

³Los parámetros calculados a partir de la ecuación ajustada: $p = a + b[1 - e^{-c(t - \text{latencia})}]$ para $t > \text{latencia}$; donde p es la proporción (%) de desaparición de NDF de las bolsas de nylon después de **t** horas de incubación; **a** es la fracción (%) de desaparición

rápidamente; **b** es la fracción (%) de desaparición lentamente; **c** es la tasa de fracción de desaparición (h^{-1}) de la fracción b

Desaparición de materia seca in sacco

5 Los efectos de los conservadores en la desaparición de DM en 12, 24, y 48 h incluyendo la cinética de desaparición se ilustran en la Tabla 5. No hubo tiempo de latencia en la desaparición de DM Las muestras de heno tratadas con el aditivo microbiano (*P. anomala*) tuvieron

10 mayor desaparición de DM en todos los puntos de tiempo de incubación (12, 24 y 48 h) en comparación con los tratamientos de control y ácido propiónico; excepto en 48 h. cuando todos los aditivos (incluyendo enzimas con una actividad quitinasa y ácido propiónico) fueron mayores que

15 el control. De forma similar, tanto la tasa como la desaparición DM efectiva fueron mayores en muestras de heno tratadas con los aditivos microbianos en comparación con los tratamientos de control y ácido propiónico. En comparación con todos los otros tratamientos, las muestras

20 de heno de los embalajes tratados con *P. anomala* tuvieron la tasa más rápida de desaparición DM (0.114 h^{-1}). La tasa más lenta de 0.083 h^{-1} y 0.087 h^{-1} se observó en el tratamiento de ácido propiónico y los tratamientos de control. Todos los aditivos aumentaron la fracción de DM

25 potencialmente digerible, excepto las enzimas con una

actividad quitinasa las cuales tuvieron un valor similar al del control. A pesar de ello, la desaparición de DM efectiva en la muestra tratada con *P. anomala* fue mayor que en los tratamientos de control y ácido propiónico.

5 Tabla 6. Efecto de los conservadores ¹ de heno en la desaparición (%) ² de NDF de heno del alfalfa-bromo incubado en el rumen de vacas Jersey.

	Desaparición ³				
		PA	CE	BPA	CON
	12 h	41.06 ^b	37.28 ^c	39.04 ^{bc}	39.64 ^{bc}
10	24 h	51.88 ^{ab}	49.22 ^b	51.88 ^{ab}	51.11 ^b
	48 h	58.23 ^b	56.07 ^c	60.19 ^{ab}	58.38 ^{ab}
	<i>Cinética</i>				
	a	19.28	19.90	19.11	18.80
	b	40.48	37.67	43.59	41.54
	c, h ⁻¹	0.078	0.076	0.069	0.070
	Latencia	1.89 ^b	3.67 ^a	2.87 ^{ab}	1.91 ^b
	<i>Potencial</i>	59.76 ^{bc}	57.57 ^c	62.70 ^a	60.34 ^b
15	<i>Efectivo</i>	39.87 ^b	36.66 ^b	38.84 ^b	38.94 ^b

¹PA=*Pichia anomala*; CE= enzimas con una actividad quitinasa BPA=Ácido Propiónico; CON=Control.

²Los medios en la misma fila con diferentes superíndices difieren ($P < 0.05$).

20 ³Los parámetros calculados a partir de la ecuación ajustada: $p = a + b[1 - e^{-c(t - \text{latencia})}]$ para $t > \text{latencia}$; donde p es la proporción (%) de desaparición de NDF de las bolsas de nylon después de **t** horas de incubación; **a** es la fracción (%) de desaparición
 25 rápidamente; **b** es la fracción (%) de desaparición

lentamente; **c** es la tasa de fracción de desaparición (h^{-1}) de la fracción b

Aunque no existieron diferencias entre los tratamientos en término de la tasa de desaparición de NDF, la fracción de desaparición rápidamente y la fracción de desaparición lentamente, la desaparición efectiva fue mayor en el heno tratado con *P. anomala* en comparación con todos los otros tratamientos (Tabla 6). El tiempo de latencia más prolongado en la desaparición de NDF se observó en el heno tratado con enzimas con una actividad quitinasa (3.67 h) mientras que el tiempo de latencia más corto de 1.89 h se observó en el tratamiento con *P. anomala*. El último tiempo de latencia no fue diferente del de los otros tratamientos. La desaparición de NDF total en 12, 24 y 48 h oscilo de 37.28% (en heno) tratado con enzimas con una actividad de quitinasa a 47.06% (el mayor) en el tratamiento con *P. anomala* con otros tratamientos que tiene valores intermedios. Una tendencia similar se observó en la desaparición de 24 h. La desaparición de NDF después de 48 h fue la más baja en los tratamientos con enzimas con una actividad de quitinasa en comparación con todos los otros tratamientos.

Los datos de desaparición de DM *in sacco* sugieren que *P. anomala* aumentó la fracción potencialmente digerible, así como la tasa fraccional y la desaparición

efectiva del heno en comparación con el control. De hecho, los valores de desaparición efectiva del heno tratado con *P. anomala* fueron superiores a los de los tratamientos de control y ácido propiónico.

5 Ejemplo 2:

Heno, condiciones de tratamiento y embalaje

El heno fue heno de alfalfa y se cosecho el 15 de agosto del 2012 en Fort Macleod, Alberta, Canadá. El heno de alfalfa se dejó marchitar en campo a niveles de humedad
10 en aproximadamente 24% y aproximadamente 30% La humedad de embalaje se determinó como en el Ejemplo 1.

La tasa de aplicación de la combinación de *P. anomala* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa fue respectivamente 10^{11} CFU y 1.5 g en
15 1L de agua por tonelada de heno. En consecuencia, la tasa de aplicación de la combinación de *P. pentosaceus* junto con la enzima que una actividad quitinasa de 10^{11} CFU y 1.5 g en 1L por tonelada de heno. Se aplicó producto de ácido propiónico compuesto de ácido propiónico al 68% (vol/vol) a
20 una tasa de 2.72 L/ton y se consideró como un control positivo. El control negativo fue agua, y se aplicó a una tasa de 1 L por tonelada de heno. Se realizaron cinco embalajes redondos grandes de aproximadamente 800 kg de acuerdo con el Ejemplo 1 para cada tratamiento el mismo
25 día. Las muestras de centro de los embalajes a través de

todos los tratamientos se recolectaron en el día 80, 90 y 180 después del embalaje para analizar su valor nutricional, producto de fermentación y cambios microbianos.

5 Las muestras de centro colectadas el día 0 y 90, 180 después del embalaje se sometieron a análisis microbiológicos y químicos. Los análisis microbiológicos se realizaron para enumerar, aislar y caracterizar los micro organismos (bacterias, levaduras y mohos totales) en placas
10 apropiadas a través de dilución serial.

Tabla 7. Conteos microbianos en heno de alfa tratado con diversos conservadores de heno en el embalaje.

	TRATAMIENTO	Días	Control	Pichia + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
15	Peso Registro de bacterias totales cfu/g DM	0	5.92	5.28	6.22	6.34
		90	7.79 ^{ab}	7.34 ^{bc}	6.69 ^c	8.49 ^a
		180	8.27 ^a	6.25 ^b	6.08 ^b	8.25 ^a
	LEVADURA	0	4.94	4.98	5.86	5.49
		90	6.57	4.70	5.05	6.22
		180	5.13	4.69	4.40	4.89
20	MOHO	0	4.83	4.79	4.99	4.66
		90	5.89	5.81	5.85	5.91
		180	6.49 ^a	6.92 ^a	6.69 ^a	5.36 ^b

El perfil microbiológico del heno después de cada tratamiento fue similar en el embalaje para las bacterias, levaduras y mohos totales incluso si las diferencias
25 numéricas se registraron. Después de 90 días del embalaje,

el conteo de bacterias total se redujo por el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pediococcus pentosaceus* cuando se compara con el tratamiento de control y ácido Propiónico, mientras el

5 tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anomala* tendió a tener un conteo bacteriano inferior. La reducción numérica de levadura se reportó para los dos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anomala* o

10 *Pediococcus pentosaceus* en contraste con el tratamiento de control y de ácido Propiónico. El conteo de moho no se afectó por los tratamientos excepto después de 180 días donde el conteo de moho se redujo por el tratamiento de ácido Propiónico.

15 Los análisis químicos se realizaron para determinar el pH, DM, nitrógeno total, amoníaco, NDF, ADF, nitrógeno insoluble de detergente ácido (ADIN), carbohidratos solubles en agua, ácidos grasos volátiles (VFA) y ácido láctico (LA).

20 Tabla 8 Composición química del heno de alfalfa en los días 0, 90 y 180 después del tratamiento con conservador de heno en el embalaje.

TRATAMIENTO	Días	Control	Picha + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido Propiónico
DM %	0	68.9 ^{ad}	76.5 ^{bc}	80.4 ^a	66.9 ^d
	90	82.6 ^b	85.6 ^a	87.3 ^a	79.8 ^c
	180	83.7 ^{bc}	87.9 ^a	88.5 ^a	80.1 ^c
NDF	0	39.3	39.6	38.6	40.1
	90	55.5 ^a	47.7 ^{cd}	45.2 ^d	53.0 ^{ab}
	180	51.3	54.8	55.3	54.6
ADF %	0	28.3	29.4	28.9	28.7
	90	39.1 ^a	31.6 ^{cd}	30.5 ^d	37.1 ^{ab}
	180	33.7 ^c	37.6 ^{ab}	35.4 ^{bc}	38.2 ^a
TN %	0	3.7	3.7	3.5	3.9
	90	3.7	3.7	3.8	4.1
	180	3.8 ^b	3.8 ^b	3.8 ^b	4.2 ^a
ADIN % N	0	7.2 ^a	5.0 ^b	5.1 ^b	7.3 ^a
	90	17.8 ^a	10.6 ^b	8.7 ^b	18.8 ^a
	180	12.3 ^b	16.9 ^{ab}	15.4 ^b	20.1 ^a

Enzimas que tienen una actividad quitinasa
 combinada con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*,
 enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con
Pichia anomala o *Pediococcus pentosaceus*, enzimas que
 tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anomala*
 o *Pediococcus pentosaceus*

Tabla 9 Producto de fermentación de alfa tratado
 con diferentes conservadores de heno en el embalaje

	TRATAMIENTO	Días	Control	Pichia + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
5	pH	0	6.16 ^b	6.23 ^a	6.23 ^a	6.07 ^c
		90	7.64 ^a	5.92 ^b	5.87 ^b	8.29 ^a
		180	7.40 ^{ab}	6.15 ^c	6.03 ^c	7.80 ^a
	LA g/kg DM	90	0.32	0.26	0.17	0.49
		180	0.26	0.11	0.10	0.17
10	Succínico	90	0.26	0.25	0.24	0.20
		180	0.23	0.23	0.24	0.28
	Acético	90	0.04	0.31	0.29	0.42
		180	0.29	0.29	0.63	0.71
	Propiónico	90	NA	NA	NA	0.08
		180	NA	NA	NA	0.04
	VFA Total	90	0.04	0.31	0.33	0.50
		180	0.29	0.29	0.66	0.76

El proceso fermentativo de heno no se impactó fuertemente por los tratamientos con las enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* debido a que este material de forraje no es propensa a fermentar tampoco. Sin embargo, el pH inferior después de 90 días para el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinado con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*

Las muestras de centro se colectaron el día 180 y evaluaron para calidad nutricional utilizando método *in situ* e *in vitro*.

Los experimentos *in situ* se realizaron para

evaluar el efecto de los conservadores de heno en la tasa y grado de digestión de las muestras de heno recolectadas 180 días después del embalaje. Se utilizaron tres vacas provistas con cánulas ruminales y se alimentaron con una
 5 dieta de procedencia de corral de engorde estándar. Aproximadamente 4 g de cada muestra combinada de cada embalaje (réplica) por tratamiento se pesó en bolsas Dacron e incubó por triplicado en cada vaca durante 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Las bolsas se recuperaron
 10 después de la incubación y procesaron de acuerdo con LRC SOP para determinar la desaparición de DM y NDF ruminal *in situ*.

Tabla 11 Parámetros *in situ* para heno de alfa tratado con conservadores de heno en el embalaje.

15

TRATAMIENTO	Control	<i>Pichia</i> + enzimas	<i>Pedio</i> + enzimas	Ácido Propiónico
a	26.61 ^{bc}	30.05 ^{ab}	33.79 ^a	23.64 [°]
b	46.80 ^{ab}	43.08 ^{bc}	39.67 ^c	51.69 ^a
c	0.05 ^c	0.06 ^{bc}	0.07 ^{ab}	0.04 [°]
latencia	1.80 ^{bc}	3.90 ^{abc}	4.30 ^{abc}	1.70 [°]
a+b	73.4	73.1	73.5	75.3

20

a = la fracción degradable rápidamente
 b = la fracción degradable lentamente
 c = la tasa a la cual se degrada b (/h)
 lag = tiempo de latencia (h)

Los datos *in situ* mostrados en la Tabla 11 revelan un material de heno más digerible para los tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa
 25 combinada con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*.

También se realizó el tratamiento *in vitro* para evaluar el efecto de los inoculantes microbianos en la producción de gas y cinética de muestras de heno de 180 días. Se realizaron dos ejecuciones por fluido de rumen mezclado de tres vacas provistas con cánulas ruminales y alimentadas con una dieta de procedencia de corral de engorde estándar. Aproximadamente 0.5 g de cada muestra combinada de heno de 180d por tratamiento se pesó en el frasco e incubó por triplicado en cada ejecución y se midió el gas durante 3, 6, 9, 12, 24 y 48h. Los frascos se recuperaron después de la incubación y se procesaron de acuerdo con LRC SOP para determinar la desaparición de DM ruminal, producción de gas, amonio y VFA *in vitro*.

Tabla 12 Digestibilidad *in vitro* de heno de alfa tratado con conservadores de heno en el embalaje.

TRATAMIENTO	Control	Pichia + enzimas	Pedio+ enzimas	Ácido propiónico
DMD g/kg	426 ^d	470 ^b	488 ^b	431 ^d
<i>a</i>	174 ^c	188 ^{bc}	196 ^{ab}	177 ^c
<i>c</i>	6.4 ^c	7.7 ^{bc}	8.4 ^b	6.6 ^c
<i>latencia</i>	0.54 ^a	0.08 ^b	0.06 ^b	0.48 ^a

a = producción de gas asintótica (mL g⁻¹ DM)

c = tasa de fermentación de la tasa de producción de gas fraccional (mL h⁻¹)

lag = tiempo de latencia (h)

La digestibilidad y fermentabilidad *in vitro* del heno en el día 180 confirmó los resultados *in situ* de una digestibilidad mejorada para ambos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia*

anomala o *Pediococcus pentosaceus*.

Estabilidad de temperatura

La temperatura de los embalajes individuales se monitoreó al medir continuamente la temperatura interior a través del periodo de almacenamiento con tres (3) Dallas Thermochron iButtons (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY) insertados en el interior de cada embalaje inmediatamente después de la cosecha (ilustrada en fotografías). La temperatura se registró en intervalos de 4 horas durante 10 semanas.

Como se muestra en la Figura 2, los tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* ambos muestran una temperatura promedio reducida durante un periodo de 60 días post-embalaje. El tratamiento de ácido Propiónico tuvo la temperatura media más alta a través del tiempo.

El efecto es particularmente significativo como se muestra en la Figura 3. La Figura 3 ilustra el tiempo transcurrido por encima de 40°C para cada tratamiento. Debido a que esta temperatura se reconoce en gran medida como el umbral para los daños de ADIN, ilustra la intensidad de la temperatura interior de los lotes de heno. El tratamiento de ácido Propiónico pasó el tiempo más prolongado por encima de 40°C. El tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con

Pediococcus pentosaceus pasó el tiempo más corto por encima de 40°C, seguido por el tratamiento con enzimas que tienen una actividad quitinasa combinada con *Pichia anomala*, ambos tratamientos con enzimas que tienen una actividad quitinasa
5 combinada con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* pasaron menos tiempo por encima de 40°C que el control.

En conclusión, la combinación de enzimas que tienen una actividad quitinasa con *Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus* redujo la temperatura interior de
10 los embalajes de heno, el pH y los números de bacterias totales en comparación con el control y el ácido Propiónico en el periodo de almacenamiento. También aumentaron la desaparición de materia seca *in situ* (DMD) y la tasa de digestión así como la DMD y la tasa de producción de gas *in*
15 *vitro*. Esto puede explicarse por el contenido de NDF y ADF inferior en estos dos tratamientos.

Ejemplo 3

Este ejemplo muestra que la enzima tiene una actividad quitinasa que incluso se mejora incluso más desde
20 el punto de vista de su efecto de conservador y su capacidad para evitar y/o reducir el daño por calor en heno de alta humedad si al menos una enzima que tiene una actividad quitinasa se combina con una levadura del genero *Pichia* o bacteria del género *Pediococcus*.

25 El heno se cosechó y se dejó marchitar en campo a

niveles de humedad como en el ejemplo 2.

La tasa de aplicación de la combinación de *P. anomala* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa fue respectivamente 10^{11} CFU y 1.5 g en 1L de agua por tonelada de heno. En consecuencia, la tasa de aplicación de la combinación de *P. pentosaceus* en combinación con la enzima que tiene una actividad quitinasa de 10^{11} CFU y 1.5 g en 1L de agua por tonelada de heno. La tasa de aplicación de *P. anomala* sola fue de 10^{11} CFU en 1 L por tonelada de heno. La tasa de aplicación de *P. pentosaceus* sola fue de 10^{11} CFU en 1 L por tonelada de heno. La enzima que tiene una actividad quitinasa sola se aplicó a una tasa de 1.5 g (suspendida en 1 L de agua) por tonelada de heno. El producto de ácido propiónico consistió de ácido propiónico al 68% (vol/vol) y se aplicó a una tasa de 2.72 L/ton y consideró como un control positivo. El control negativo fue agua, y se aplicó a una tasa de 1 L por tonelada de heno. Se realizaron cinco embalajes redondos grandes de aproximadamente 800 kg de acuerdo con el Ejemplo 1 para cada tratamiento el mismo día.

Como en el ejemplo 2, la temperatura de los embalajes individuales se monitoreó al medir continuamente la temperatura interior a través del periodo de almacenamiento con tres (3) Dallas Thermochron iButtons (Embedded Data Systems, Lawrenceburg, KY) insertados en el

interior de cada embalaje inmediatamente después de la cosecha (ilustrados en fotografías). La temperatura se registró en intervalos de 4 horas durante 10 semanas. Como se muestra en la Figura 4, cuando al menos una enzima que
5 tiene una actividad quitinasa se combina con *P. anomala* o *P. pentosaceus*, la reducción de temperatura del heno de alta humedad se mejora sorprendentemente de forma significativa por la combinación, en comparación con el uso de cada componente de la combinación.

10 Ejemplo 4

Objetivo del ensayo.

Este ensayo expande las implementaciones de una prueba de concepto para un aditivo de heno que reduciría el calentamiento de los embalajes fabricados bajo condiciones
15 de cosecha desafiantes (contenido de humedad mayor que el óptimo). Siguió un ensayo similar que utiliza un modelo a escala de laboratorio. El ensayo siguió el perfil de temperatura de los embalajes cuadrado pequeños (~25 kg, 79.9% DM) inoculados utilizando diferentes combinaciones de
20 dos microorganismos (*Pichia anomala* o *Pediococcus pentosaceus*) con dos enzimas (quitinasa pura o una enzima comercial que contienen actividades de pectin liasa, glucanasa y quitinasa).

Metodología.

25 El ensayo se realizó en embalajes cuadrados

pequeños de mezcla de alfalfa-pasto (45:55), y que tienen un peso medio de 25.0 kg al momento de la cosecha. El nivel de humedad medio de los embalajes fue de 79.9% DM, dentro del margen del nivel de materia seca esperado (80-83% DM).

5 Los embalajes se inocularon con el tratamiento diferente después de la aspersión del forraje en frente de la cámara de corte del embalador, mediante un aplicador de inoculante Dorhmann. El diseño experimental permitió la aplicación de un control y cuatro mezclas aditivas diferentes de los

10 aditivos microbianos (ninguno, *Pichia anomala* + quitinasa, *Pichia anomala* + mezcla de enzimas, *Pediococcus pentosaceus* + quitinasa, *Pediococcus pentosaceus* + mezclas de enzimas).

Para cada tratamiento, se rociaron seis embalajes cuadrados en tres bloques de dos embalajes. Los embalajes

15 se transportaron al cobertizo de almacenamiento, se pesaron y colocaron en tarimas, en un patrón aleatorizado completo pre-definido de manera que ninguna superficie estuvo en contacto con otro embalaje. Cada embalaje se equipó con una sonda de temperatura en su centro geométrico. Los embalajes

20 se almacenaron durante 100 días.

Resultados.

Generalmente, los tratamientos inoculados con *Pichia anomala* (#2, y 3 en la tabla 13) mostraron un efecto en el retraso del calentamiento de los embalajes, pero

25 mezclar *Pichia anomala* t quitinasa (#3) retrasó

significativamente el calentamiento y el tiempo que la temperatura de los embalajes es 5°C y 10°C sobre la temperatura ambiente (Tabla 13). Este tratamiento también mostró una temperatura inferior durante la fase entre 400 y 5 600 horas de incubación. La adición de la mezcla de enzimas con la cepa de *Pichia anomala* resulta en cierta mejora numérica incluso aunque la mejora fue inferior que con la mezcla de quitinasa.

Las mezclas de *Pediococcus pentosaceus* (#4 y 5) 10 permitieron un periodo más prolongado de calentamiento antes de que inicie el calentamiento de los embalajes. El uso de ambos tipos de enzimas resultó en beneficios comparables con una reducción del tiempo transcurrido 10°C por encima de la temperatura ambiente (Tabla 13).

15 *Tabla 13.* Descripción del tratamiento y datos relacionados con el tiempo en relación con el perfil de temperatura

20

25

Número de tratamiento	Aditivo microbiano	Aditivo de Enzima	Tiempo 5 Celsius por encima de ambiente (h)	Tiempo 10 Celsius por encima de ambiente (h)
1	Ninguno	No	390.6	290.6 a
2	<i>Pichia anomala</i>	Mezcla de enzimas	295.2	193.9 ab
3	<i>Pichia anomala</i>	Quitinasa	230.0	120.4 b
4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Mezcla de enzimas	320.4	196.3 ab
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Quitinasa	329.6	224.4 ab
			P=0.0971 EEM = 58.24	P=0.0394 EEM = 50.43

10

Aunque la invención se ha descrito junto con las modalidades específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta descripción se pretende que cubra cualesquier variaciones, usos o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente descripción que entran dentro de la práctica conocida o personalizada dentro de la técnica a la cual pertenece la invención y como pueda aplicarse a las características esenciales establecidas en la presente en lo anterior, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones anexas.